



Teh kering dalam kemasan



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu	1
6 Pengambilan contoh	2
7 Cara uji	2
8 Syarat lulus uji	3
9 Higiene.....	3
10 Pengemasan.....	3
11 Penandaan	3
Lampiran A (normatif) Cara uji teh kering dalam kemasan	4
Bibliografi.....	32
Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer <i>Butterfield's Phosphate Buffered Dilution Water (BPB)</i>	26
Tabel A.1 – Larutan standar asam galat.....	7
Tabel A.2 – APM/1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/mL; 0,01 g/mL; dan 0,001 g/mL.....	30

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Teh kering dalam kemasan* ini merupakan revisi SNI 01–3836–2000 *Teh kering dalam kemasan*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut :

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan olahan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri teh kering dalam kemasan.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan hal-hal yang tertera dalam :

1. Undang-Undang Republik Indonesia No.5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No.36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No.7 Tahun 1996 tentang Pangan.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No.69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No.28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 75/M-IND/PER/7/2010 tentang Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.
8. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
9. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK. 00. 06. 52. 4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Pangan.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 67-04-S1 Minuman dan Tembakau yang telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 7 Oktober 2011 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, Lembaga Ilmu Pengetahuan dan Teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 27 Februari 2012 sampai dengan tanggal 26 April 2012 dengan hasil akhir RASNI.

Teh kering dalam kemasan

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, cara uji, pengemasan dan penandaan teh kering dalam kemasan.

2 Acuan normatif

Untuk acuan tidak bertanggal berlaku edisi terakhir (termasuk revisi dan atau amandemen)

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

3.1

teh kering dalam kemasan

produk teh kering (*Camellia sinensis* L) tunggal atau campuran dari: teh hitam, teh hijau, teh oolong, teh putih, teh wangi, dan atau teh beraroma lain, dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan atau bahan tambahan pangan yang diijinkan sesuai ketentuan yang berlaku, dan dikemas serta siap diseduh

4 Komposisi

4.1 Bahan baku

Daun teh (*Camellia sinensis* L).

4.2 Bahan pangan lain

Bahan pangan yang diizinkan untuk teh kering dalam kemasan sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk teh kering dalam kemasan sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

5 Syarat mutu

Syarat mutu teh kering dalam kemasan sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 - Syarat mutu teh kering dalam kemasan

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan air seduhan		

1.1	Warna	-	khas produk teh
-----	-------	---	-----------------

Tabel 1 - Syarat mutu teh kering dalam kemasan (lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1.2	Bau	-	khas produk teh
1.3	Rasa	-	khas produk teh
2	Kadar polifenol (b/b)	%	min. 5.2
3	Kadar air (b/b)	%	maks. 8,0
4	Kadar ekstrak dalam air (b/b)	%	min. 32
5	Kadar abu total (b/b)	%	maks. 8,0
6	Kadar abu larut dalam air dari abu total (b/b)	%	min. 45
7	Kadar abu tak larut dalam asam (b/b)	%	maks. 1,0
8	Alkalinitas abu larut dalam air (sebagai KOH) (b/b)	%	1 – 3
9	Serat kasar (b/b)	%	maks. 16,5
10	Cemaran logam		
10.1	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2
10.2	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 2,0
10.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0
10.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
11	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 1,0
12	Cemaran mikroba:		
12.1	Angka lempeng total (ALT)	koloni/g	maks. 3×10^3
12.2	Bakteri <i>Coliform</i>	APM/g	< 3
12.3	Kapang	koloni/g	maks. 5×10^2

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

7 Cara uji

Cara uji untuk teh kering dalam kemasan seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1

- b) Cara uji keadaan air seduhan sesuai Lampiran A.2
- c) Cara uji kadar polifenol sesuai Lampiran A.3
- d) Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.4
- e) Cara uji kadar ekstrak dalam air sesuai Lampiran A.5
- f) Cara uji kadar abu total sesuai Lampiran A.6
- g) Cara uji kadar abu larut dalam air dari abu total sesuai Lampiran A.7
- h) Cara uji kadar abu tak larut dalam asam sesuai Lampiran A.8
- i) Cara uji alkalinitas abu larut dalam air (sebagai KOH) sesuai Lampiran A.9
- j) Cara uji serat kasar sesuai Lampiran A.10
- k) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.11
 - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.11.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.11.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.11.3
- l) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.12
- m) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.13
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.13.1
 - Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran A.13.2
 - Cara uji bakteri *Coliform* sesuai Lampiran A.13.3
 - Cara uji kapang sesuai Lampiran A.13.4

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Tabel 1.

9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

10 Pengemasan

Teh kering dalam kemasan dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.

Lampiran A
(normatif)
Cara uji teh kering dalam kemasan

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan sejumlah teh kering dalam kemasan secara aseptik, kemudian diaduk sampai merata, dan ambil contoh teh kering dalam kemasan sebanyak 300 gram secara aseptik selanjutnya tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Contoh teh kering dalam kemasan diaduk kembali sampai merata, ambil contoh teh kering dalam kemasan secukupnya dan tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.1.4 Persiapan contoh untuk uji kimia

Contoh teh kering dalam kemasan diaduk kembali sampai merata, ambil contoh teh kering dalam kemasan sebanyak 300 gram dan tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan air seduhan**A.2.1 Warna****A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Peralatan

- a) Neraca analitis terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) Tempat perebus air;
- c) Pemanas;
- d) Cangkir pencoba porselen bertutup 140 mL atau 280 mL; dan
- e) Mangkok pencoba porselen.

A.2.1.3 Cara kerja

- a) Timbang 2,80 gram contoh masukkan ke dalam cangkir pencoba porselen 140 mL atau 5,60 gram contoh ke dalam cangkir pencoba porselen 280 mL;
- b) tuangkan air suling mendidih ke dalam cangkir pencoba porselen, tutup dan biarkan selama 6 menit;
- c) tuangkan air seduhan ke dalam mangkok pencoba porselen dan usahakan ampas seduhan tidak terikut;

- d) lakukan pengamatan terhadap warna seduhan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli dengan kriteria penilaian warna yang meliputi jenis warna dan sifat air seduhan

A.2.1.4 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terlihat warna asing, maka hasil dinyatakan “khas produk teh”; dan
- b) jika terlihat warna asing, maka hasil dinyatakan “tidak normal”.

A.2.2 Bau

A.2.2.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.2.2 Peralatan

- a) Neraca analitis terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) Tempat perebus air;
- c) Pemanas;
- d) Cangkir pencoba porselen bertutup 140 mL atau 280 mL; dan
- e) Mangkok pencoba porselen.

A.2.2.3 Cara kerja

- e) Timbang 2,80 gram contoh masukkan ke dalam cangkir pencoba porselen 140 mL atau 5,60 gram contoh ke dalam cangkir pencoba porselen 280 mL;
- f) tuangkan air suling mendidih ke dalam cangkir pencoba porselen, tutup dan biarkan selama 6 menit;
- g) tuangkan air seduhan ke dalam mangkok pencoba porselen dan usahakan ampas seduhan tidak terikut;
- h) lakukan pengamatan terhadap bau seduhan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli dengan kriteria penilaian bau yang meliputi bau khas teh dan bau pewangi yang sengaja ditambahkan serta ada tidaknya bau asing bukan teh maupun bukan bau pewangi yang sengaja ditambahkan.

A.2.2.4 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan “khas produk teh”; dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan “tidak normal”.

A.2.3 Rasa

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.3.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.3.2 Peralatan

- Neraca analitis terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Tempat perebus air;
- Pemanas;
- Cangkir pencoba porselen bertutup 140 mL atau 280 mL; dan
- Mangkok pencoba porselen.

A.2.3.3 Cara kerja

- Timbang 2,80 gram contoh masukkan ke dalam cangkir pencoba porselen 140 mL atau 5,60 gram contoh ke dalam cangkir pencoba porselen 280 mL;
- tuangkan air suling mendidih ke dalam cangkir pencoba porselen, tutup dan biarkan selama 6 menit;
- tuangkan air seduhan ke dalam mangkok pencoba porselen dan usahakan ampas seduhan tidak terikut;
- lakukan pengamatan terhadap rasa air seduhan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli dengan kriteria penilaian sebagai berikut:

rasa : meliputi kekuatan rasa dan ada tidaknya rasa asing

- kekuatan rasa adalah kombinasi rasa yang membentuk rasa khas teh dan kekuatan rasa penyedap yang sengaja ditambahkan.
- rasa asing adalah rasa yang menyimpang dari rasa khas teh maupun rasa pewangi yang ditambahkan.

A.2.3.4 Cara menyatakan hasil

- Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "khas produk teh"; dan
- jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.3 Kadar polifenol

A.3.1 Prinsip

Polifenol diekstrak dari contoh uji daun teh menggunakan metanol 70 % pada suhu 70 °C. Polifenol terekstrak diukur secara *colorimetric* menggunakan pereaksi Fenol Folin-Ciocalteu. Pereaksi mengandung asam fosfo-tungstat sebagai oksidan, dimana pada reaksi reduksi gugus hidroksi fenolat teroksidasi menghasilkan kompleks biru molibdenum-tungsten yang dibaca pada panjang gelombang 765 nm. Pereaksi Fenol Folin-Ciocalteu bereaksi dengan berbagai senyawa polifenol, meskipun reaksi dengan masing-masing jenis polifenol memberikan respon yang beragam, pemilihan asam galat sebagai standar kalibrasi dapat digunakan untuk mengukur kadar polifenol total.

A.3.2 Pereaksi

- Air suling;
- Metanol;
- Metanol 70 % (fraksi volum);
tambahkann 700 mL metanol (A.3.2 b) ke dalam labu ukur 1 L, kemudian encerkan dengan air suling tepat 1 L dan kocok.
- Pereaksi Fenol Folin- Ciocalteu;
sebaiknya dicek linieritas kalibrasi terhadap asam galat untuk memastikan kelayakan dari pereaksi yang tersedia.
- Pereaksi Fenol Folin Ciocalteu 10 % (fraksi volum);

pindahkan 20 mL Fenol Folin- Ciocalteu (A.3.2 d) menggunakan pipet ke dalam labu ukur 200 mL, tambahkan air dan tepatkan sampai tanda tera kemudian kocok. Siapkan larutan pereaksi Fenol Folin-Ciocalteu dalam kondisi baru setiap akan melakukan pengujian.

- f) Larutan sodium karbonat (Na_2CO_3) 7,5 % (konsentrasi masa); timbang ($37,50 \pm 0,01$) gram Na_2CO_3 *anhidrat* ke dalam 500 mL labu ukur volumetrik. Tambahkan air suling hangat secara hati-hati sampai volumenya mencapai setengah volum labu ukur kemudian kocok, selanjutnya dinginkan larutan sampai suhu kamar dan encerkan sampai tanda tera.

CATATAN Larutan ini akan tetap stabil pada suhu kamar selama satu bulan.

- g) Larutan baku standar asam galat, 1000 $\mu\text{g/mL}$ asam galat *anhidrat*; dan timbang ($0,110 \pm 0,001$) gram asam galat monohidrat (BM = 188,14) ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian larutkan menggunakan air suling, encerkan sampai tanda tera dan kocok hingga homogen. Siapkan larutan standar dalam kondisi baru.

CATATAN Untuk meningkatkan kelarutan asam galat dalam air suling, maka asam galat monohidrat harus dalam keadaan anhidrat. Standar asam galat harus bersertifikat level pereaksi, misalnya A.C.S (*American Chemical Society*) yang mencerminkan bahwa zat-zat kimia yang terkandung di dalamnya telah memenuhi spesifikasi pereaksi. Adapun jika tidak, maka harus ditentukan kadar airnya terlebih dahulu (pemanasan pada suhu 103 °C). Selanjutnya konsentrasi larutan baku standar asam galat anhidrat dapat dihitung.

- h) Larutan standar asam galat; pindahkan sejumlah larutan baku standar asam galat (A.3.2 g) menggunakan pipet sebagaimana yang tercantum pada Tabel 1, kemudian encerkan sampai volumenya mencapai tanda tera labu ukur 100 mL dan kocok. Larutan standar ini harus dibuat pada hari yang sama dengan pelaksanaan pengujian.

Tabel A.1 – Larutan standar asam galat

Larutan asam galat standar	Volume stok larutan asam galat (mL)	Konsentrasi larutan standar yang diencerkan ($\mu\text{g/mL}$)
A	1,0	10
B	2,0	20
C	3,0	30
D	4,0	40
E	5,0	50

A.3.3 Peralatan

- Timbangan analitis terkalibrasi dengan ketelitian 0,001 gram;
- Penangas air terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C
- Dispenser atau pipet volum 5 mL;
- Sentrifuse, dengan kemampuan 3500 RPM;
- Spektrofotometer UV-Vis terkalibrasi;
- Pipet ukur;
- Labu ukur 100 mL, 200 mL, 500 mL, dan 1 L;
- Vortex mixer*;
- Tabung ekstraksi bertutup 10 mL ; dan
- Tabung reaksi bertutup berukuran 10 mL. (sebelum digunakan, tabung reaksi harus dicuci menggunakan asam nitrat (HNO_3), dan dibilas menggunakan air kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 100 °C).

A.3.4 Cara kerja

A.3.4.1 Pembuatan deret standar

- Pindahkan 1,0 mL masing-masing larutan standar asam galat A, B, C, D, E ke dalam gelas ukur 10 mL yang berbeda;
- masukkan 1,0 mL air suling ke dalam gelas ukur 10 mL sebagai larutan blanko;
- tambahkan 5,0 mL pereaksi Fenol Folin-Ciocalteu ke dalam masing-masing langkah a) dan b);
- setelah 3 menit sampai 8 menit penambahan Fenol Folin-Ciocalteu, tambahkan 4,0 mL larutan Na_2CO_3 7,5 % (A.3.2 f) ke dalam masing-masing tabung, tutup dan kocok;
- diamkan pada suhu ruang sekitar 50 menit, kemudian ukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 765 nm;
- lakukan pekerjaan duplo;
- larutan blanko harus memiliki absorbansi $< 0,010$. Jika nilainya $>$ dari 0,010 menandakan adanya kontaminasi yang disebabkan kualitas air yang tidak sesuai standar atau peralatan;
- hitung masa standar asam galat anhidrat dalam masing-masing 1 mL larutan standar asam galat A, B, C, D, dan E, menggunakan persamaan berikut:

$$m (\mu\text{g/mL}) = \frac{(M_0 \times V \times w_{DM, std} \times 10000)}{100 \times 100}$$

Keterangan:

- M_0 adalah masa asam galat monohidrat yang digunakan untuk pembuatan larutan standar baku, dinyatakan dalam gram (g);
- V adalah volum larutan standar asam galat, dinyatakan dalam milliliter (mL);
- $w_{DM, std}$ adalah berat kering asam galat, dinyatakan dalam % (fraksi masa).

- buat grafik linieritas standar, masa asam galat anhidrat dalam standar A, B, C, D, dan E (μg) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y.

Kurva kalibrasi harus linier. Perbedaan *slope* garis kalibrasi yang diperoleh harus mendekati 0,0001 untuk hasil perhitungan pekerjaan duplo. Kurva kalibrasi harus memiliki intersep yang mendekati aslinya. Jika nilai intersep yang diperoleh berdasarkan absorbansi y- axis $> \pm 0,04$, maka patut dicurigai. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh kandungan air dalam asam galat, persiapan larutan standar atau kalibrasi pipetnya.

A.3.5.2 Penentuan kadar polifenol

- Contoh uji digiling dan diaduk supaya homogen, kemudian dimasukkan ke dalam botol contoh tertutup dan hindarkan dari cahaya;
- timbang ($0,200 \pm 0,001$) gram contoh uji dalam tabung ekstraksi;
- panaskan methanol 70 % (A.3.2 d) dalam penangas air pada suhu 70 °C minimal selama 30 menit supaya terjadi kesetimbangan;
- panaskan tabung ekstraksi berisi teh dalam penangas air yang sama pada suhu 70 °C, kemudian tambahkan methanol 70 % (A.3.2 d), tutup dan aduk dalam *vortex mixer*;
- panaskan kembali tabung ekstraksi berisi campuran contoh uji dan methanol 70 % (A.3.2 d) dalam penangas air pada suhu 70 °C selama 10 menit, dan kocok menggunakan *vortex mixer* pada menit ke -5 dan ke -10 supaya proses ekstraksi berjalan sempurna;
- angkat tabung ekstraksi berisi campuran contoh uji dan metanol 70 % (A.3.2 d) dari penangas air dan dinginkan sampai suhu ruangan. Buka tutup tabung ekstraksi dan pusingkan tabung ekstraksi dalam sentrifuse dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit
- pisahkan supernatan ke dalam tabung reaksi 10 mL;

- h) ulangi proses d) sampai f) campur hasil ekstraksi, tambahkan methanol 70 % (A.3.2 d) hingga volumenya mencapai 10 mL dan kocok;
- i) biarkan hasil ekstraksi g) pada suhu ruang. Ekstrak ini akan stabil selama 24 jam pada suhu 4 °C;
- j) pindahkan sebanyak 1,0 mL ekstrak contoh uji ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian encerkan menggunakan air suling sampai tanda tera dan kocok;
- k) masukkan 1,0 mL ekstrak contoh uji yang telah diencerkan kedalam tabung reaksi 10 mL;
- j) tambahkan 5,0 mL pereaksi Fenol Folin-Ciocalteu;
- k) setelah 3 menit sampai 8 menit penambahan fenol folin-ciocalteu, tambahkan 4,0 mL larutan sodium karbonat (Na_2CO_3) ke dalam masing-masing tabung, tutup dan kocok;
- l) biarkan pada suhu ruang sekitar 50 menit, kemudian ukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 765 nm;
- m) lakukan pekerjaan duplo; dan
- n) ulangi pengujian secara *colorimetric*, dengan menaikkan tingkat pengenceran jika absorbansinya lebih tinggi dari absorbansi standar asam galat 50 µg (larutan standar asam galat E)

A.3.5 Perhitungan

$$\text{kadar polifenol (\%)} = \frac{(D_{\text{sampel}} - D_{\text{intersep}}) \times V_{\text{sampel}} \times d}{S_{\text{std}} \times m_{\text{sampel}} \times 10000 \times W_{\text{DM,sampel}}} \times 100 \%$$

Keterangan:

D_{sampel}	adalah absorbansi larutan contoh;
D_{intersep}	adalah absorbansi yang diperoleh untuk konsentrasi larutan blanko;
S_{std}	adalah slope kurva kalibrasi;
m_{sampel}	adalah masa contoh uji, dinyatakan dalam gram (g);
V_{sampel}	adalah volume larutan ekstraksi contoh uji, dinyatakan dalam milliliter (mL);
d	adalah faktor pengenceran;
$W_{\text{DM,sampel}}$	adalah bobot sampel atas dasar bahan kering, dinyatakan dalam % (fraksi masa).

A.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar polifenol. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.4 Kadar air

A.4.1 Prinsip

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

A.4.2 Peralatan

- a) Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Desikator berisi desikan; dan
- d) Cawan platina bertutup.

A.4.3 Cara kerja

- Panaskan cawan dan tutupnya dalam oven pada suhu $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (cawan dan tutupnya) (W_0);
- masukan 5 gram contoh ke dalam cawan, tutup dan timbang (W_1);
- panaskan cawan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup cawan di samping cawan di dalam oven pada suhu $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama tiga jam;
- tutup cawan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 sampai dengan 30 menit kemudian timbang;
- lakukan pemanasan kembali selama satu jam dan ulangi kembali perubahan berat antara pemanasan selama satu jam mempunyai interval $\leq 1 \text{ mg}$ (W_2);
- lakukan pekerjaan duplo; dan
- hitung kadar air dalam contoh.

A.4.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100 \%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

A.4.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.5 Kadar ekstrak dalam air

A.5.1 Prinsip

Kadar ekstrak dalam air dihitung dari bagian yang larut dalam air mendidih, disaring dan diuapkan. Hasil saringan dikeringkan dan ditimbang.

A.5.2 Peralatan

- Oven terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- Panangas air;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Desikator berisi desikan;
- Cawan platina bertutup;
- Gelas piala 300 mL;
- Labu ukur berukuran 500 mL; dan
- Pipet volumetrik berukuran 50 mL.

A.5.3 Cara kerja

- Panaskan cawan dalam oven pada suhu $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (W_0);

- b) masukan contoh uji sebanyak 2 gram ke dalam gelas piala 300 mL (W_1);
- c) tambahkan 200 mL air mendidih dan diamkan selama 1 jam;
- d) saring ke dalam labu ukur 500 mL dan bilas dengan air panas sampai warna larutannya menjadi jernih atau bening, kemudian dinginkan dan tepatkan sampai tanda garis dengan air suling;
- e) pipet 50 mL filtrat ke dalam cawan yang telah diketahui bobotnya dan keringkan di atas penangas air;
- f) panaskan dalam oven selama dua jam, dinginkan dalam desikator dan timbang;
- g) panaskan kembali dalam oven selama satu jam, dinginkan dalam desikator dan timbang (W_2), ulangi pekerjaan hingga perbedaan hasil penimbangan tidak melebihi 1 mg;
- h) lakukan pekerjaan duplo; dan
- i) hitung kadar ekstrak dalam air.

A.5.4 Perhitungan

$$\text{Kadar ekstrak dalam air (\%)} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times P \times \frac{100}{100 - KA} \times 100$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);
 W_1 adalah bobot cawan kosong, tutupnya, dan contoh uji, dinyatakan dalam gram (g);
 W_2 adalah bobot cawan kosong, tutupnya, dan contoh terekstrak, dinyatakan dalam gram (g);
 P adalah pengenceran; dan
 KA adalah kadar air

A.5.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar ekstrak dalam air. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.6 Kadar abu total

A.6.1 Prinsip

Kadar abu dihitung berdasarkan bobot abu yang terbentuk selama pembakaran dalam tanur pada suhu $(525 \pm 25)^\circ\text{C}$ sampai terbentuk abu berwarna putih.

A.6.2 Peralatan

- a) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- b) Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- c) Pemanas listrik;
- d) Panangas air;
- e) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- f) Desikator yang berisikan desikan; dan
- g) Cawan platina, kuarsa atau porselen yang berukuran 50 mL sampai 100 mL.

A.6.3 Cara kerja

- a) Panaskan cawan dalam tanur pada suhu $(525 \pm 25)^\circ\text{C}$ selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 30 menit kemudian timbang dengan neraca analitik (W_0);

- b) masukkan 5 g sampai 10 g contoh ke dalam cawan dan timbang (W_1);
- c) panaskan cawan yang berisi contoh tersebut dalam oven pada suhu $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$ sampai H_2O hilang;
- d) tempatkan cawan yang berisi contoh tersebut dalam tanur pada suhu $(525 \pm 25) ^\circ\text{C}$ sampai terbentuk abu berwarna putih;
- e) tambahkan air ke dalam abu, keringkan dalam penangas air kemudian lanjutkan pada pemanas listrik kemudian abukan kembali pada suhu $(525 \pm 25) ^\circ\text{C}$ sampai perbedaan masa dua penimbangan tidak melebihi 1mg;
- f) pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 30 menit kemudian timbang (W_2);
- g) lakukan pekerjaan duplo, dan
- h) hitung kadar abu dalam contoh.

A.6.4 Perhitungan

$$\text{Kadar abu total (\%)} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100 \%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot cawan dan contoh sebelum diabukan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot cawan dan contoh setelah diabukan, dinyatakan dalam gram (g).

A.6.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar abu total. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.7 Kadar abu larut dalam air dari abu total

A.7.1 Prinsip

Abu tak larut dalam air diperoleh dari pengabuan hasil penyaringan setelah ekstraksi abu total dengan air panas. Selisihnya dengan abu total adalah abu larut dalam air.

A.7.2 Peralatan

- a) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- b) Panangas air;
- c) Kertas saring tak berabu;
- d) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- e) Desikator yang berisikan desikan; dan
- f) Cawan platina, kuarsa atau porselen yang berukuran 30 mL sampai 100 mL.

A.7.3 Cara kerja

- a) Contoh yang digunakan adalah abu yang berasal dari penentuan kadar abu total (W). Tambahkan 20 mL air suling ke dalam cawan yang berisi abu total, panaskan sampai hampir mendidih dan saring dengan kertas saring bebas abu;
- b) bilas cawan dan kertas saring beserta isinya dengan air panas hingga jumlah filtrat kira-kira 60 mL. Simpan filtrat untuk penetapan alkalinitas abu larut dalam air;
- c) pindahkan kertas saring dan isinya ke cawan semula, uapkan dengan hati-hati di atas penangas air;
- d) abukan dalam tanur listrik pada suhu $(525 \pm 25) ^\circ\text{C}$ sampai bebas karbon;

- e) pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 30 menit kemudian timbang (W_3). Ulangi pekerjaan hingga perbedaan hasil penimbangan tidak melebihi 1 mg;
- f) lakukan pekerjaan duplo, dan
- g) hitung kadar abu larut dalam air.

A.7.4 Perhitungan

$$\text{Abu tak larut dalam air (\%)} = \frac{W_3}{W} \times \frac{100}{100-KA} \times 100 \%$$

Keterangan:

W adalah bobot contoh pada penetapan abu total, dinyatakan dalam gram (g);

W_3 adalah bobot abu tak larut dalam air, dinyatakan dalam gram (g);

KA adalah kadar air, dinyatakan dalam %

$$\text{Abu larut dalam air} = \frac{W_4 - W_3}{W} \times \frac{100}{100-KA} \times 100$$

Keterangan:

W_3 adalah bobot abu tak larut dalam air, dinyatakan dalam gram (g);

W_4 adalah bobot abu toatal, dinyatakan dalam gram (g)

A.7.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar abu larut dalam air dari abu total. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.8 Kadar abu tak larut dalam asam

A.8.1 Prinsip

Perlakuan abu total dengan larutan asam klorida, penyaringan, pengabuan dan penimbangan residu.

A.8.2 Peralatan

- a) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- b) Panangas air;
- c) Kertas saring tak berabu;
- d) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- e) Desikator yang berisikan desikan; dan
- f) Cawan platina, kuarsa atau porselen yang berukuran 30 mL sampai 100 mL.

A.8.3 Pereaksi

- a) Larutan asam klorida (HCl) 40 % (fraksi volum); pipet 10 mL asam klorida pekat, kemudian tambahkan air suling sebanyak 25 mL dan homogenkan;
- b) perak nitrat (AgNO_3) (17 gram / liter larutan).

A.8.4 Cara kerja

- Contoh uji merupakan abu tak larut dalam air (W_3)
- tambahkan 25 mL HCl 40 % (A.8.3 a) ke dalam cawan yang berisi contoh pada butir a, tutup cawan untuk menghindari percikan dan didihkan larutan hati-hati selama sepuluh menit di atas penangas air;
- dinginkan dan saring larutan menggunakan kertas saring tak berabu. Bilas menggunakan air panas hingga air pencuci bebas dari asam. Hal ini dapat diuji dengan larutan AgNO_3 (8.3. b);
- tempatkan kembali kertas saring dan isi ke dalam cawan, uapkan hati-hati di atas penangas air yang mendidih, kemudian panaskan dalam tanur pada suhu $(525 \pm 25) ^\circ\text{C}$, hingga partikel bebas karbon;
- segera pindahkan dan dinginkan cawan ke dalam desikator selama 30 menit dan timbang (W_4). Ulangi pekerjaan hingga perbedaan hasil penimbangan tidak melebihi 1 mg;
- lakukan pekerjaan duplo; dan
- hitung kadar abu tak larut dalam asam.

A.8.5 Perhitungan

$$\text{Kadar abu tak larut dalam asam (\%)} = \frac{W_4}{W_3} \times \frac{100}{100 - \text{KA}} \times 100$$

Keterangan:

W_4 adalah bobot contoh pada penetapan abu total, dinyatakan dalam gram (g);

W_3 adalah bobot abu tak larut dalam air, dinyatakan dalam gram (g).

KA adalah kadar air, dinyatakan dalam %

A.8.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar abu tak larut dalam asam. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.9 Alkalinitas abu larut dalam air (sebagai KOH)

A.9.1 Prinsip

Peniteran hasil saringan yang diperoleh dari penetapan abu yang larut dalam air dengan larutan asam klorida dan indikator metal jingga

A.9.2 Peralatan

- Gelas piala 250 mL; dan
- Buret 50 mL.

A.9.3 Pereaksi

- Larutan asam klorida (HCl) 0,1 N;
- indikator metal jingga; dan
- air suling.

A.9.4 Cara kerja

- Contoh yang digunakan adalah filtrat yang diperoleh dari penetapan kadar abu larut dalam air;
- tempatkan filtrat dalam gelas piala kemudian titrasi dengan larutan HCl 0,1 N menggunakan indikator metal jingga.

A.9.5 Perhitungan

$$\text{Alkalinitas abu larut dalam air (sebagai KOH) (\%)} = \frac{V \times N \times 0,0561}{W} \times \frac{100}{100-KA} \times 100$$

Keterangan:

- W adalah bobot contoh pada penetapan abu total, dinyatakan dalam gram (g);
 V adalah volume larutan yang diperlukan untuk titrasi contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 N adalah normalitas larutan HCl.

A.10 Serat kasar

A.10.1 Prinsip

Serat kasar adalah bagian yang tak dapat dihidrolisis oleh asam sulfat (H₂SO₄) 1,25 % (konsentrasi masa) dan natrium hidroksida (NaOH) 1,25 % (konsentrasi masa), bahan tersebut dihitung secara gravimetri.

A.10.2 Peralatan

- Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pendingin;
- Corong *Buchner*;
- Pompa vakum;
- Kertas saring tak berabu yang mempunyai spesifikasi *particle retention liquid* sebesar 20-25 µm;
- Gelas piala 500 mL;
- Cawan aluminium atau porselen;
- Mortar; dan
- Sudip atau sendok.

A.10.3 Pereaksi

- Pertroleum eter;
- Larutan asam sulfat (H₂SO₄) 1,25 %;
Larutkan 13,02 mL H₂SO₄ p.a (96 %) ke dalam air suling, lalu tera hingga 1000 mL.
- Larutan natrium hidroksida (NaOH) 3,25 %; dan
Larutkan 1,25 g NaOH ke dalam 100 mL air suling.
- Etanol 95 %.

A.10.4 Cara kerja

- Timbang 2 gram sampai 4 gram contoh (W) ke dalam gelas piala 500 mL, tambahkan 50 mL larutan H₂SO₄ 1,25 % (A.10.3 b) kemudian didihkan selama 30 menit dengan menggunakan pendingin tegak;
- tambahkan 50 mL larutan NaOH 3,25 % (A.10.3 b), kemudian didihkan selama 30 menit menggunakan pendingin tegak;

- c) dalam keadaan panas, saring dengan menggunakan corong *buchner* yang berisi kertas saring kering yang telah diketahui bobotnya;
- d) cuci endapan yang terdapat pada kertas saring berturut-turut dengan H₂SO₄ 1,25 % panas (A.10.3 b), air panas dan etanol 96 %;
- e) angkat kertas saring beserta isinya, masukkan ke oven dan keringkan pada suhu 105 °C dinginkan dan timbang sampai bobot tetap (W₂);
- f) jika ternyata kadar serat kasar lebih dari 1 %, abukan kertas saring beserta isinya, timbang sampai bobot tetap (W₂); dan
- g) lakukan pekerjaan duplo.

A.10.5 Perhitungan

$$\text{Serat kasar (\%)} = \frac{W_2 - W_1}{W} \times 100 \%$$

Keterangan:

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 W₁ adalah bobot abu, dinyatakan dalam gram (g);
 W₂ adalah bobot endapan, dinyatakan dalam gram (g).

A.10.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil serat kasar. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.11 Cemarkan logam

A.11.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

A.11.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada suhu 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.11.1.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Penangas air;
- f) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- g) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- h) Gelas ukur kapasitas 10 mL;
- i) Gelas piala 250 mL;
- j) Cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 mL - 100 mL;
- k) Botol *polypropylene*; dan
- l) Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20-25 µm.

A.11.1.3 Pereaksi

- a) Larutan asam nitrat pekat (HNO_3) 65 % (Bj 1,4);
- b) Larutan asam klorida pekat (HCl) 37 % (Bj 1,19);
- c) Larutan asam nitrat (HNO_3) 0,1 N;
encerkan 7 mL HNO_3 65 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- d) Larutan asam klorida (HCl) 6 N;
encerkan 500 mL HCl 37 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- e) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- f) Larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- g) Larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- h) Larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,2 $\mu\text{g/mL}$; 0,4 $\mu\text{g/mL}$; 0,8 $\mu\text{g/mL}$; 1,4 $\mu\text{g/mL}$ dan 1,8 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- i) Larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- j) Larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ Pb; dan
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 $\mu\text{g/mL}$.
- k) Larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,25 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 1,0 $\mu\text{g/mL}$; 1,5 $\mu\text{g/mL}$ dan 2,0 $\mu\text{g/mL}$ Pb.

A.11.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh dengan teliti dalam cawan porselin/ platina/ kuarsa (m);
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur pada suhu $(450 \pm 5) ^\circ\text{C}$ sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO_3 pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;

- e) keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 450 °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO₃ pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO₃ 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol *polypropylene*;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorban larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorban sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan hitung kandungan logam dalam contoh.

A.11.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam, (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah kandungan logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL);
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.11.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.11.2 Timah (Sn)

A.11.2.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan HNO₃ dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂.

A.11.2.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) Penangas air;
- d) Pemanas listrik;
- e) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- f) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- g) Pipet ukur berskala 10 mL kapasitas 5 mL dan 0,1 mL terkalibrasi;
- h) Erlenmeyer 250 mL;
- i) Gelas ukur kapasitas 50 mL; dan
- j) Gelas piala 250 mL.

A.11.2.3 Pereaksi

- Larutan kalium klorida (KCl), 10 mg/mL K;
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 mL.
- Asam nitrat (HNO₃) pekat;
- Asam klorida (HCl) pekat;
- Larutan baku 1 000 µg/mL Sn; dan
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL asam HCl pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku kerja Sn.
pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1 000 µg/mL Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL dan 25 µg/mL Sn.

A.11.2.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g (m) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL HNO₃ pekat dan biarkan 15 menit;
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat erlenmeyer dari penangas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl₂ berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling (V);
- tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada temperatur ruang, tera dengan air suling dan saring;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbanss larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbanss sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Sn dalam contoh;

A.11.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL)

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.11.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.11.3 Merkuri (Hg)

A.11.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbansi Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

A.11.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida ("HVG");
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Penangas listrik;
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm - 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin Raschig setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- Labu ukur 1000 mL, 500 mL, dan 100 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL; dan
Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;

A.11.3.3 Pereaksi

- Asam sulfat (H_2SO_4) 9 M;
- Asam nitrat (HNO_3) 7 M;
- Batu didih;
- Campuran asam nitrat (HNO_3) : asam klorat (HClO_4) (1:1);
- Hidrogen peroksida (H_2O_2);
- Larutan natrium molibdat 2 %.
- Larutan pereduksi;
campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan kedalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan pengencer;
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling kedalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian 67 mL H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
larutkan 0,1354 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ Hg; dan

Pipet 1 mL larutan baku 1000 mg/l Hg ke dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 mg/l.

l) Larutan baku kerja Hg;

Pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1 mg/l ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025 µg/mL; 0,005 µg/mL; 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL Hg.

A.11.3.4 Cara kerja

A.11.3.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g contoh (m) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H_2SO_4 9 M, 20 mL HNO_3 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- tambahkan 20 mL campuran $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4$ (1:1) melalui pendingin;
- hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- didihkan lagi selama 10 menit;
- matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.11.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";

- f) baca absorbanss larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbanss sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh;

A.11.3.4.3 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi merkuri (Hg) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 fp adalah faktor pengenceran.

A.11.3.4.4 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.12 Cemaran arsen

A.12.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimum 193,7 nm.

A.12.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) *Microwave digester* ;
- d) Labu Kjeldahl 250 mL;
- e) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- f) *Burner* atau *bunsen*;
- g) Pemanas listrik;
- h) Labu ukur 1000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- i) Pipet volumetrik 25 mL;
- j) Cawan porselen kapasitas 50 mL;
- k) Gelas ukur 25 mL;
- l) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- m) Labu borosilikat berdasar bulat 50 mL.

A.12.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat (HNO_3) pekat;

- b) Asam perklorat (HClO_4) pekat;
- c) Natrium boronhidrida (NaBH_4) 4 %;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.
- d) Asam klorida (HCl) 8 M;
larutkan 66 mL HCl 37 % kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) Timah (II) klorida ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 10 %;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam piala gelas 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl 37 %. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- f) Kalium iodida (KI) 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- g) Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- h) Larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ As;
larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ As;
pipet 10 mL larutan baku arsen 1000 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ As.
- j) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As; dan
pipet 1 mL larutan standar arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ As.
- k) Larutan baku kerja As;
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,05 $\mu\text{g/mL}$ As.

A.12.4 Cara kerja

A.12.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai 10 g contoh (m) kedalam labu Kjeldahl 250 mL, tambahkan 5 mL sampai 10 mL HNO_3 pekat dan 4 mL sampai 8 mL H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 mL HClO_4 70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL H_2O dan 5 mL amonim oksalat jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0.1 mL KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;

- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- j) baca absorbanss larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbanss sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

A.12.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat.
- b) masukkan ke dalam oven *microwave* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, Uapkan di atas penangas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu 450°C (± 1 jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20 % dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$; 0,05 $\mu\text{g/mL}$ serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbanss tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbanss sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan hitung kandungan As dalam contoh

A.12.4.3 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen (As) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$)
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.12.4.4 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.13 Cemarkan mikroba

A.13.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total, Bakteri *Coliform* dan Kapang

A.13.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel minuman dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam minuman. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh minuman yang ditetapkan.

A.13.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf;
- Pemanas listrik;
- Neraca kapasitas 2000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Labu ukur 1000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Labu erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 10,0 dan 1,0 mL terkalibrasi ;
- Tabung reaksi; dan
- Pisau, sendok, gunting, dan spatula steril.

A.13.1.3 Larutan Pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- | | |
|----------------------------|--------|
| - KH_2PO_4 | 34 g |
| - Air suling | 500 mL |

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit

A.13.1.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.13.2 Angka lempeng total

A.13.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

A.13.2.2 Peralatan

- Lemari pengeram (inkubator) $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- Alat penghitung koloni (*colony counter*);

- e) Penangas air;
- f) Cawan petri gelas/plastik diameter 15 mm x 90 mm steril; dan
- g) Pipet ukur 10 mL, 5 mL, dan 1 mL steril.

A.13.2.3 Pembenihan dan pengencer

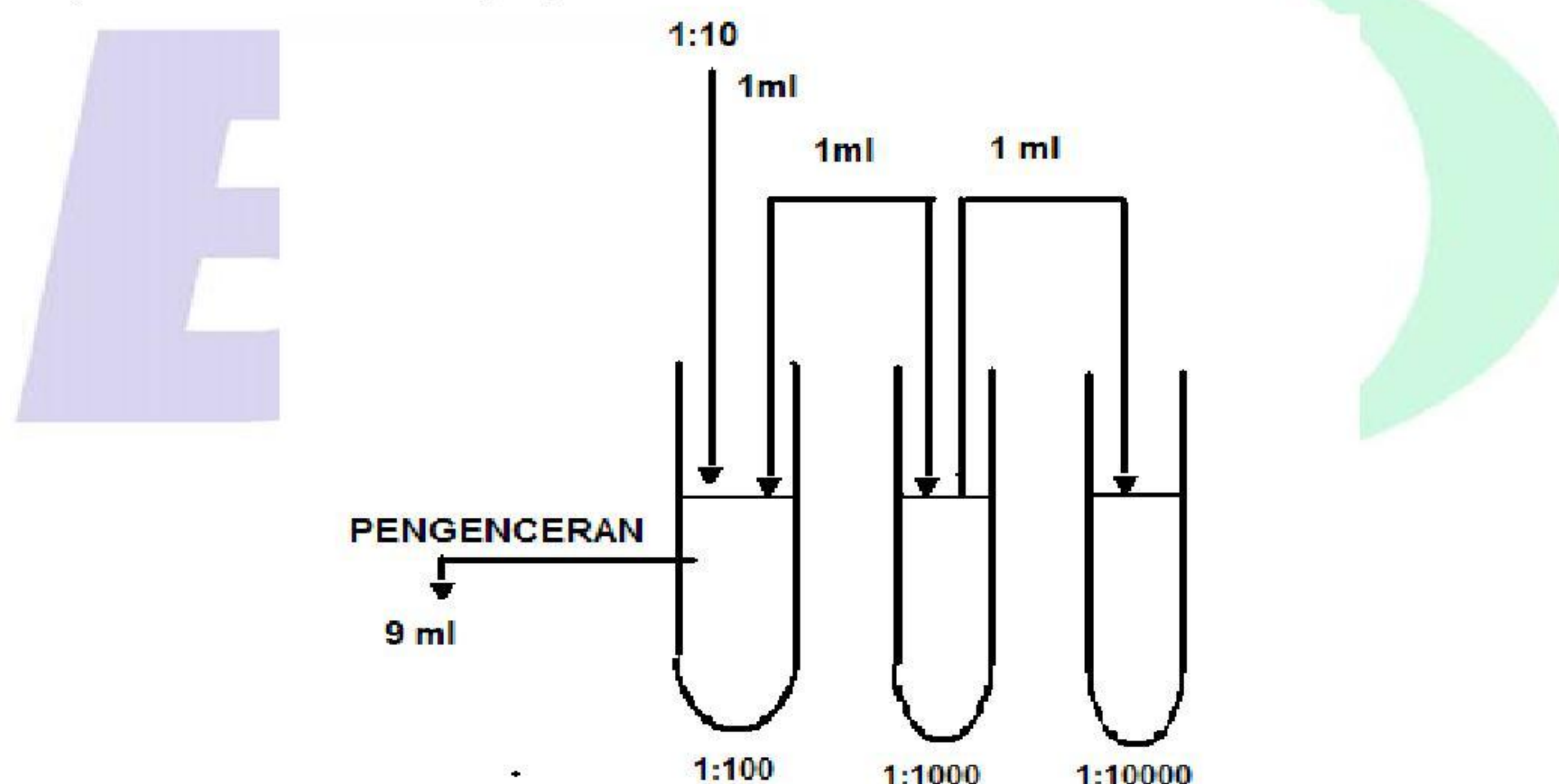
Plate count agar (PCA)

– Tryptone	5 g
– Yeast extract	2,5 g
– Glukosa	1 g
– Agar	15 g
– Air suling	1 000 mL

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.13.2.4 Cara kerja

- a) Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar B.1 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB)*;
- b) pipet masing-masing 1 mL dari tingkat pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} ke dalam cawan petri steril secara duplo;



Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate Buffered Dilution Water (BPB)*.

- c) tuangkan 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang masih cair dengan suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan petri;
- d) goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;
- e) kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- f) biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- g) masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengeram pada suhu $30 ^\circ\text{C}$ selama (72 ± 2) jam; dan
- h) catat pertumbuhan koloni (n) pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 72 jam.

A.13.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/mL) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata - rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per mililiter (koloni/mL);
 F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.13.2.6 Pernyataan hasil

A.13.2.6.1 Cara menghitung

- Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per mililiter;
- jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per mililiter;

Contoh :

$\frac{10^{-2}}{120}$	$\frac{10^{-3}}{25}$
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per mililiter dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;
 n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua;
 d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

$\frac{10^{-2}}{131}$	$\frac{10^{-3}}{30}$
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
 – jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6.5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 (5.9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25 koloni, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni perambat;
Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
- merupakan rantai yang tidak terpisah;
 - perambat yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
 - perambatan yang terjadi pada pinggir atau penukaran pembenihan.
- Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka uap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.13.2.6.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut
- bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.13.3 Bakteri *Coliform*

A.13.3.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung Durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

A.13.3.2 Peralatan

- Lemari pengering (inkubator), $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- Rak untuk tabung reaksi;
- Pipet Mohr 1 mL dan 10 mL berskala;
- Botol pengenceran (± 20 mL) gelas borosilikat yang resisten, dengan sumbat karet atau tutup uliran;
- Tabung reaksi;
- Tabung Durham;

- h) Cawan petri gelas ukuran 15 mm × 100 mm atau plastik ukuran 15 mm x 90 mm, steril; dan
- i) Jarum ose (inokulasi), dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

A.13.3.3 Pembenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose* (LST) *broth* / *lauryl tryptose* (LT) *broth*; dan
- b) *Brilliant green lactose bile* (BGLB) *broth* 2 %.

A.13.3.4 Cara kerja

A.13.3.4.1 APM - Uji pendugaan untuk bakteri *Coliform*

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.13.1;
- b) inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulfate tryptose* (LST) *broth* yang di dalamnya terdapat tabung Durham terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke-(24 ± 2). Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) catat adanya pembentukan gas setelah inkubasi (48 ± 2) jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif"; dan
- g) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif untuk uji pendugaan.

A.13.3.4.2 APM - Uji penegasan untuk bakteri *Coliform*

- a) Kocok tabung LST *broth* yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung BGLB *broth* 2 % yang berlainan;
- c) masukkan tabung-tabung BGLB *broth* 2 % ke dalam inkubator pada suhu 35°C selama (48 ± 2) jam;
- d) catat semua tabung BGLB *broth* yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan Tabel B.1, tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB *broth* yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama (48 ± 2) jam pada 35 °C; dan
- e) laporkan sebagai APM bakteri *Coliform* per gram.

Tabel A.2 – APM/1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/mL; 0,01 g/mL; dan 0,001 g/mL

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

A.13.4 Kapang

A.13.4.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama 5 hari.

A.13.4.2 Peralatan

- Inkubator $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Penangas air $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- Alat penghitung koloni;
- Mikroskop;
- Cawan petri 15 mm x 100 mm; dan
- Pipet ukur 10 mL dan 1 mL.

A.13.4.3 Pembenihan dan pengencer

Pilihan penggunaan media:

- Media dengan penambahan larutan antibiotik;
 - *Dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC) agar;
 - *Dichloran 18 % glycerol* (DG 18) agar;
- Plate count agar* (PCA);
 tambahkan 100 mg *chloramphenicol* per liter jika menggunakan media ini. Media ini tidak cocok jika diduga ada kapang menyebar (contoh *Mucor*, *Rhizopus* dll);

- c) *Malt agar* (MA);
- d) *Malt extract agar* (kapang dan khamir) (MEAYM); atau
- e) *Potato dextrose agar* (PDA):

- <i>Infusion from white potatoes</i>	200 g
- <i>Dextrose</i>	20 g
- <i>Agar</i>	20 g
- <i>Air suling</i>	1000 mL

Larutkan semua bahan di atas. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit. Sebelum dipergunakan dinginkan sampai 50 °C dan pH diatur 3,5 dengan asam tartrat 10 % steril. Penurunan pH dapat diganti dengan penambahan 4 mL antibiotik (1 g/100 mL). Campurkan, kemudian tuangkan ke dalam cawan petri.

- f) Larutan antibiotik:
antibiotik ditambahkan dalam media kapang dan khamir untuk mencegah pertumbuhan bakteri. *Chloramphenicol* adalah salah satu pilihan antibiotik, karena stabil saat diotoklaf. Kandungan antibiotik yang diizinkan adalah 100 mg per liter media. Jika tampak pertumbuhan bakteri, siapkan media dengan penambahan 50 mg per liter *chloramphenicol* sebelum otoklaf dan 50 mg per liter *chlortetracycline* steril saat media mulai di kondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.

A.13.4.4 Cara kerja

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai A.13.1;
- b) terdapat dua metode persiapan media dalam cawan, yaitu :
 - metode menyebar pada cawan (untuk pilihan media DRBC dan DG 18):
pipet 0,1 mL masing-masing pengenceran secara aseptik ke dalam media padat dan sebar merata dengan menggunakan batang gelas.
 - metode menuang pada cawan (untuk pilihan media DG 18):
pipet 1,0 mL masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri 15 mm × 100 mm dan sesegera mungkin tuangkan 20 mL sampai dengan 25 mL media. Campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam dalam jangka 1 menit sampai dengan 2 menit.
- c) biarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku;
- d) masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator dan inkubasi pada ruang gelap bersuhu 25 °C selama 5 hari. Jangan menumpuk cawan lebih dari 3 tumpukan. Biarkan cawan dan jangan merubah posisinya;
- e) hitung koloni pada cawan sesudah 5 hari inkubasi. Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu inkubasi selama 48 jam. Jangan menghitung cawan-cawan sampai waktu inkubasi berakhir, karena merubah posisi cawan dapat mengakibatkan pertumbuhan sekunder dari spora; dan
- f) nyatakan hasil perhitungan sebagai jumlah kapang dan khamir per gram contoh;

A.13.4.5 Pernyataan hasil

A.13.4.6 Cara menghitung

Hitung cawan yang berisi 10 koloni sampai dengan 150 koloni.

A.13.4.6.1 Cara menghitung dan membulatkan angka

Cara menghitung dan membulatkan angka kapang seperti cara menghitung dan membulatkan angka pada angka lempeng total.

Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2006. *AOAC Official Method 900.02, Ash of Sugars and Syrups*, Chapter 44.1.05.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2006. *AOAC Official Method 920.104, Water extract of Tea*, Chapter 30.1.34.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2006. *AOAC Official Method 934.01, Moisture in Tea*, Chapter 30.1.34.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 962.09, Fiber (Crude) in Animal Feed and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 4.6.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc*. 18th Edition, Chapter 9.1.09.
- British Standard. 1980. *Preparation of a liquor of tea for use in sensory tests*. BS 6008:1980.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Yeasts, Molds, and Mycotoxins*. Chapter 18.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.
- British Standard. 1988. *Methods of test for tea – Part 4: Determination of total ash*. BS 6049-4:1988.
- Standar Nasional Indonesia. 2009. Batasan maksimum cemaran mikroba dalam pangan. SNI: 7338:2009.
- Standar Nasional Indonesia. 2009. Batasan maksimum cemaran logam berat dalam pangan. SNI: 7387:2009.
- The International Organization for Standardization. 2005. Determination of Substances Characteristic of Green and Black Tea – Part 1: *Content of Total Polyphenols in Tea – Coloric Method Using Folin-Ciocalteu Reagent*. ISO 14502-1:2005